

SV-H-3 : LA CELLULE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE ET LA MYOGENESE

SV-H-3 Différenciation d'un type cellulaire : la cellule musculaire striée squelettique	
<p>Le membre chiridien est constitué de nombreux tissus qui assurent en particulier le soutien et la mobilité de l'organisme.</p> <p>Les cellules musculaires (ou myocytes) striées squelettiques forment des muscles insérés sur les os par des tendons, innervés par des motoneurones et irrigués par le système sanguin. La cellule musculaire est plurinucléée et organisée par des myofibrilles formées par la répétition de sarcomères qui sont les unités contractiles. Un couplage chimio-mécanique entre les filaments d'actine et de myosine assure la contraction. Cette dernière est dépendante d'un flux calcique déclenché par un potentiel d'action.</p> <p>Les cellules musculaires striées squelettiques des membres sont issues de la différenciation de cellules souches provenant des somites et donnant naissance à des précurseurs (les myoblastes). La différenciation cellulaire est un processus séquentiel ; elle implique l'arrêt de la prolifération cellulaire. La maturation</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Réaliser une préparation microscopique de muscle strié squelettique coloré ou non. - Identifier des cellules musculaires striées squelettiques en microscopies optique et électronique. - Illustrer la notion de cellule différenciée à l'aide de l'étude de la cellule musculaire striée squelettique.

I La différenciation de la CMSS

- 1 les CMSS sont issues de cellules souches, les myoblastes provenant des somites
- 2 les étapes de la myogenèse
- 3 La maturation terminale des myocytes est dépendante de leur innervation

II Les cellules musculaires striées squelettiques (CMSS) du membre chiridien sont des cellules formées par une différenciation cellulaire poussée.

1. Les CMSS se caractérisent par leur contractibilité et leur excitabilité
 - 1.1 Organisation des muscles squelettiques et des cellules musculaires striées (cf TP)
 - 1.2. le mécanisme de la contraction musculaire
 - 1.3. Innervation des muscles squelettiques et couplage excitation/contraction

Conclusion

Préambule : exercice myogenèse

THEME I- UNE ETAPE DE LA MYOGENESE : TRANSFORMATION DE MYOBLASTES EN MYOTUBES

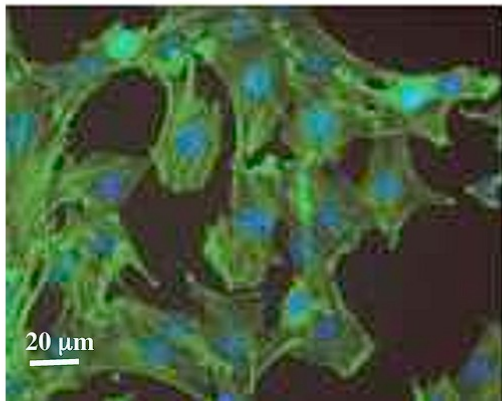
DOCUMENT I.1- Modifications d'une culture de myoblastes dans un milieu de différenciation

D'après Zeschmigg et al, J.Cell Sci., 108, 2973-2981, 1995 - Mege et al., J.Cell.Sci, 103, 897-906, 1992 - Travaglionne et al., Cell Death and Differentiation, 12, 78-86, 2005

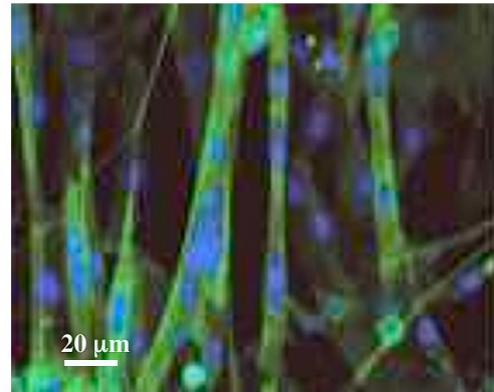
Des cultures *in vitro* de cellules musculaires embryonnaires de souris, les myoblastes, sont utilisées comme modèle pour étudier la myogenèse.

- Dans un milieu de culture dit « de prolifération », les cellules se multiplient.
- Lorsqu'elles sont transférées du milieu de prolifération vers un milieu de différenciation (= induction de la différenciation), des modifications sont observées. Néanmoins, **le nombre total de noyaux de la culture ne change pas.**

Les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Les noyaux sont colorés en bleu, les molécules d'actine sont colorées en vert.



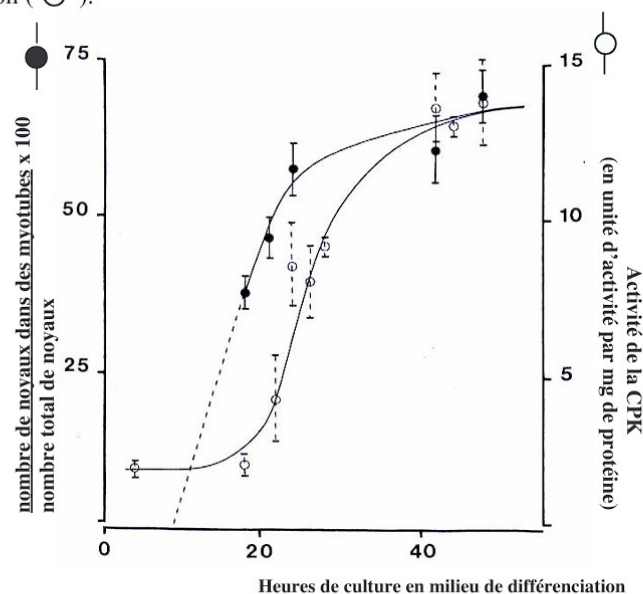
A- Culture des myoblastes en milieu de prolifération



B- Après 72 heures de culture en milieu de différenciation, les cellules se contractent spontanément et sont appelées des myotubes.

C- Le **pourcentage des noyaux qui sont présents dans des myotubes** est déterminé en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation et exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux (●).

L'**enzyme créatine phosphokinase (CPK)** s'exprime de façon spécifique chez les cellules musculaires différenciées. Son activité est mesurée (en unité d'activité par mg de protéine) en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation (○).



DOCUMENT I-2 – Cadhérines et formation de myotubes

D'après Zeschnigk et al, *J.Cell Sci.*, 108, 2973-2981, 1995 - Mege et al., *J.Cell.Sci.*, 103, 897-906, 1992

Chez les vertébrés, le processus d'adhérence cellulaire fait intervenir une famille de molécules, les cadhérines. Ce sont des glycoprotéines membranaires qui, en présence d'ions calcium, adhèrent spécifiquement aux cadhérines d'une autre surface cellulaire.

Des cadhérines musculaires ont été identifiées à la surface des myoblastes. L'implication de ces molécules dans la myogenèse est recherchée.

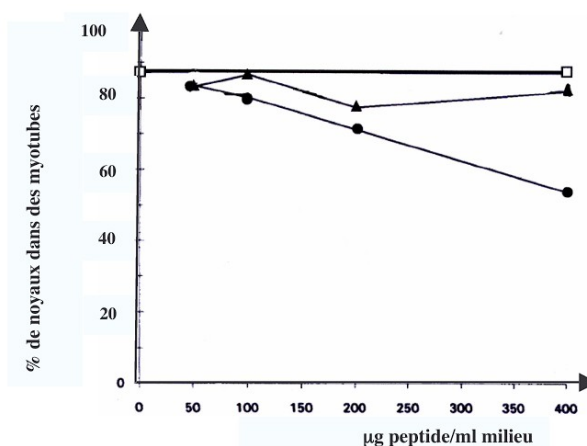
Une culture témoin de myoblastes de Poulet est effectuée dans le milieu de différenciation appelé **milieu DMEM** contenant 2 mM de Ca^{2+} .

D'autres cultures cellulaires sont effectuées dans des milieux de différenciation modifiés :

- **milieu SMEM** : milieu de différenciation à faible concentration de calcium 0,2 mM de Ca^{2+} ,
- **milieu DMEM + anticorps anti-cadhérine musculaire** à divers taux de dilution (1/500, 1/100, 1/50),
- **milieu DMEM + diverses concentrations de peptides synthétiques** :
 - * **peptide 1** : peptide synthétique de 10 acides aminés, identique à une zone de la région extracellulaire d'une cadhérine musculaire.
 - * **peptide 2** : peptide synthétique de 10 acides aminés, de même composition en acides aminés que le peptide 1 mais de séquence différente, n'existant pas dans la cadhérine.

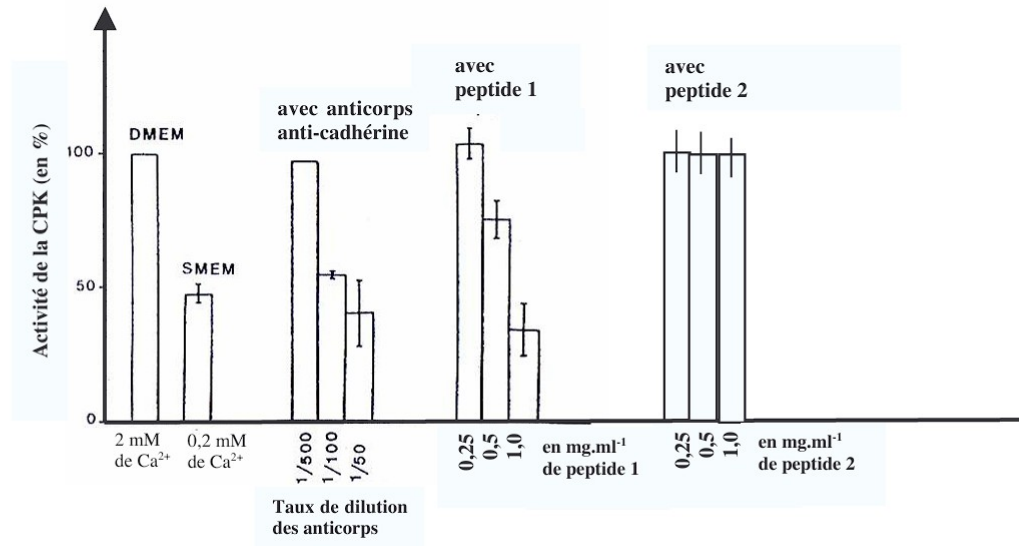
Graphique A : Le pourcentage des noyaux qui sont présents dans des myotubes, exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux, est déterminé 48 heures après le déclenchement de la différenciation en présence ou pas de peptides synthétiques.

- en absence de peptides synthétiques dans le milieu DMEM
- milieu DMEM + peptide 1
- ▲ milieu DMEM + peptide 2

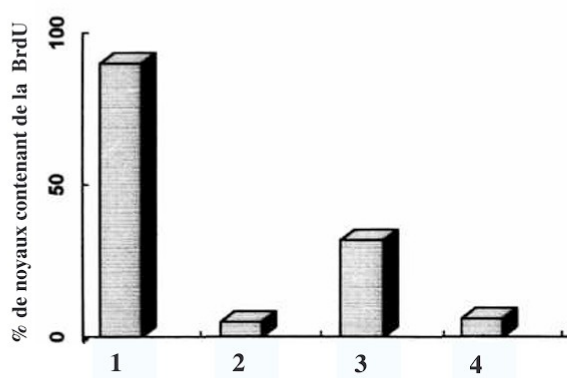


Les résultats représentent la moyenne de trois cultures indépendantes dans lesquelles 1000 noyaux ont été comptés.

Graphique B : Des myoblastes sont mis en culture dans divers milieux de différenciation. L'activité de l'enzyme créatine phosphokinase (CPK) est mesurée après 48 heures de culture. Cette activité est exprimée en pourcentage de l'activité présentée par l'enzyme dans les cellules de la culture témoin DMEM.



Graphique C : La 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU), est un nucléotide analogue de la thymidine dans lequel la base azotée thymine est remplacée par la bromo-uracile. La BrdU se substitue à la thymidine lors de la réplication de l'ADN. La BrdU est ajoutée dans différentes conditions de culture et on mesure le pourcentage de noyaux contenant de la BrdU dans l'ADN.



Ajout de la BrdU:

- 1 : dans le milieu de prolifération, avant induction de la différenciation,
- 2 : 36 heures après l'induction de la différenciation sans addition de peptides,
- 3 : 36 heures après l'induction de la différenciation
+ 400 mg/ml de peptide 1,
- 4 : 36 heures après l'induction de la différenciation
+400 mg/ml de peptide 2.